

经验交流

用氨基酸分析仪测定人尿中 3-甲基组氨酸的含量

虞莉文 曹 阳 刘亚铭

陶文洪 董旭东

(四川省农业科学院中心实验室, 成都 610066) (国家体委成都运动创伤研究所, 成都 610041)

关键词 氨基酸, 3-甲基组氨酸, 氨基酸分析仪

3-甲基组氨酸 (3-methylhistidine, 3-MH) 含量的测定, 已被广泛应用于研究肌肉蛋白质在不同条件下的代谢变化, 3-MH 是人体肌纤维蛋白中的特异氨基酸, 全身的 3-MH 有 90% 集中在骨骼肌中^[1-3], 3-MH 来源于肌纤维蛋白中特定位置上组氨酸的甲基化^[4,5]在肌纤维蛋白分解时被释放出来, 不再参加肌纤维蛋白的合成, 而是定量地从尿中排出^[6-9], 一旦出现骨骼肌的运动创伤, 尿中的 3-MH 含量将显著变化^[10,11]正常人尿中 3-MH 含量为 180—520 $\mu\text{mol}/24\text{h}$ ^[12], 因此, 准确测定人体尿中 3-MH 的含量对了解肌纤维蛋白在不同条件下的代谢变化是很有价值的。

测定人体尿中 3-MH 含量, 一般采用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS), 但此法需对样品作衍生处理, 且试剂较昂贵, 需要特殊的装置; HPLC 法的分析测试时间短, 但分析效果差, 柱前衍生及反应操作繁杂; 化学比色法对样品的处理要求较高, 测定过程易受外界影响, 结果不稳定^[13-17]。本文采用氨基酸分析仪, 将程序加以改进, 可在较短时间内, 完成尿中 3-MH 的准确定量分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器: 日本日立 835-50 型高速氨基酸分析仪。

标准品: 3-MH 由瑞典 Aliauyesni 博士和意大利 Mussoni 教授赠给, 组氨酸为色谱纯 (GC, 美国进口), 混合标样由日立公司提供, 浓度为 100 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 。

1.2 样品制备

受试者每日 6 次, 每次隔 4h 将尿样收集后, 立即加入盐酸防腐、冻存。上柱前, 取定量尿样在真空干燥器中抽空 6h, 加入等量的 10% 磷基水杨酸沉淀蛋白, 在 4500 r/min 的离心机上离心 30 min, 调 pH 至 2.2 然后上机。

1.3 缓冲液及分析条件

本实验采用 pH 分别为 3.3, 4.1 的两种锂盐系统缓冲液、柱子再生用氢氧化锂。所有试剂均为国产

分析纯或色谱纯。

分析条件: 分离柱 $\phi 2.6\text{mm} \times 150\text{mm}$, 离子交换树脂: 日立 2619 F。除氨柱 $\phi 4\text{mm} \times 50\text{mm}$ 树脂为日立 2650。

缓冲液流速: 0.275 ml/min, 压力 80—100 $\times 10^5$ Pa

茚三酮流速: 0.3 ml/min, 压力 20—30 $\times 10^5$ Pa
柱温: 65°C。比色波长: 570 nm。

定量测定采用外标法。

1.4 结果计算

3-MH 含量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = $A \times 20 \times B \times 10^{-3}$

式中 A: 3-MH 上机测定值 (每 50 μl 所含 ng 数)

B: 稀释倍数。

2 结果与讨论

2.1 相关性 通过实验证明, 所测尿样中 3-MH 出峰时间稳定, 并与相邻的峰分离良好没有重叠, 一旦人体受伤后, 尿中 3-MH 的含量明显增加。

2.2 回收率 取一定量的样品分别加入 3 种浓度不同的标准品, 按相同方法测定, 每次进样 50 μl , 各进样 3 次取平均值计算结果 (表 1)。

表 1 回收率

标准品加入量 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	回收量 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	回收率
10	9.70	97.02
50	49.04	98.08
100	101.08	101.08

2.3 精密度试验 分别取 2 个尿样, 进行同批平行测定 3 次, 批间重复测定 5 次, 其精密度试验结果如表 2。

2.4 线性关系 分别量取 3-MH 浓度为 20, 40, 60, 80, 100 ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) 的标准样品各进样 3 次, 每次 50 μl 取平均值, 以峰高为纵坐标, 浓度为横坐标作图,

峰高与浓度呈直线关系。

表 2 方法精密性

测定方式	样号	测定次数	$\bar{X} \pm SD$	变异系数 %
同批	A-11	3	514.25 $\pm$ 3.75	0.69
平行测定	B-12		950.71 $\pm$ 2.98	0.31
批间	A-11	5	515.44 $\pm$ 3.75	0.73
重复测定	B-12		954.44 $\pm$ 7.83	0.82

表中数据 ($\bar{X} \pm SD$) 系每 50 μ l 所含 ng 数

参 考 文 献

- 1 Nishizawa N *et al.* *Brit J Nutr*, 1977; 37(3): 345
- 2 Nishizawa N *et al.* *Brit J Nutr*, 1977; 38(1): 149
- 3 Wassner S J, Li J B. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1982 6(4): E293
- 4 Hardy M F, Perry S V. *Nature* (London), 1969, 223: 300
- 5 Young V R *et al.* *Biochem Biophys Acta*, 1970; 199: 297
- 6 Young V R *et al.* *J Bio Chem*, 1972; 247: 3592
- 7 Long C L *et al.* *Metabolism*, 1975; 24(8): 929
- 8 Young V R, Munro H N. *Fed Proc*, 1978; 37(9): 2291
- 9 Bachmann K *et al.* *Metabolism*, 1984; 33(2): 107
- 10 Elia M *et al.* *Brit Med J*, 1981; 282(6261): 351
- 11 Haverberg L N, Munro H N, Young V R. *Biochem Biophys Acta*, 1974; 371: 226
- 12 周立东等, 大型精密仪器专业学习班讲义——氨基酸分析仪器与方法. 广东省科委条件处, 1983; 166—170
- 13 Matthews D E, Starrew J B. *Anal Biochem*, 1981; 110: 308
- 14 Ward L C, Miller M, Hawgood S. *Chromatogr J*, 1981; 223: 417
- 15 Zunic G, Stanimiroric S, Savic J. *Chormatgr J*, 1984; 311: 69
- 16 Feldhof R C, Ballard J *et al.* *Chormatgr J*, 1984; 311: 267
- 17 Alioureshi G, Gutierrez A *et al.* *Chromatogr J*, 1986; 374: 363

制备板状凝胶的简便封漏法

黄舒牧 郭 蕾

(石家庄医专生化教研室, 石家庄 050031)

关键词 板状凝胶, 封漏法

为更好地解决灌制聚丙烯酰胺平板凝胶时的漏胶问题, 我们在多种方法的基础上提出了一种防止漏胶的更为简便可靠、经济实用的新方法。

1 材 料 和 方 法

在台面上平放一与所制胶板同样大小的玻板, 取一比凝胶板略大一些的塑料袋平放于玻板之上。将两块清洗干净的制胶玻板之间的四个角顺电泳方向各放一块长 1cm, 宽 0.3cm, 厚 0.05—0.2cm 的小塑料垫片, 其厚度根据所制胶板的厚度确定。把这两块中间保持一定空隙的玻板平放入塑料袋内, 加样的一边向袋口。把塑料袋的两外侧面(与加样边垂直)多余部分回折一下, 把袋内两块玻板包紧, 在塑料袋外面的上方再放一块与塑料袋下面同样大小的玻板, 位置与袋内玻板对齐。这样用两块玻板把包于塑料袋内的两块制胶玻板夹紧, 外用铁夹夹住或用绳子沿与电泳方向垂直的方向捆紧。将此包起来的玻板使塑料袋口向上, 直立于水槽中, 给水槽注水, 最好是 40℃ 左右的温水。通过塑料袋口往两块垫起 0.05—0.2cm 厚的玻板中间加注所配制的分离胶液, 加至所需高度, 上面再加蒸馏水少许封面。让水槽内水面略高于玻板间液面, 待

胶凝固后, 倒出封胶面的水, 再如上述程序灌制浓缩胶。

制备带凹型玻板的胶板是在已制分离胶上面放上梳齿, 其厚度与所制胶板厚度一样, 再和梳齿平行放一块与凹型玻板的凹形一样大小同厚度的玻璃块以填补凹形缺口, 再如上述方法灌浓缩胶。

2 讨 论

用上述方法制备的凝胶板有效面积接近百分之百。胶板内四个角放的小垫片仅起支撑作用, 其厚度决定凝胶的厚度, 故它的长和宽尽量小一点, 以减少占胶板的有效面积。

在没有凹形玻板时, 可用一般玻板, 另加两小块与凹形玻板突出齿同样大小的玻璃块, 拼合成凹形玻板, 如上法能灌制出同样的胶板。当凹形玻板的突出齿折断时, 可把断齿拼接于原处能同样使用。

用此方法亦可灌制梯度胶和大型板状凝胶, 也可同时灌制多块板状凝胶, 比用专用的凝胶灌制器节省胶液。